

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Helmut Coper

Über die Wirkung verschiedener Cannabinoide auf die mischfunktionellen Oxygenasen der Leber

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Warning
aus Osnabrück

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Helmut Coper

Über die Wirkung verschiedener Cannabinoide auf die mischfunktionellen Oxygenasen der Leber

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Norbert Warning
aus Osnabrück

Referent: Prof. Dr. med. H. Coper

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Hildebrandt



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14. 8. 1976

INHALTSVERZEICHNIS

=====

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Methodik</u>	3
1. Material	3
1.1. Tiermaterial	3
1.2. Versuchssubstanzen	3
1.3. Applikation	4
2. Präparation der Lebermikrosomen (in Anlehnung an J.B. Schenkman)	4
3. Chemische Bestimmungsmethoden	5
3.1. Protein	5
3.2. Bestimmung von Cytochrom P ₄₅₀ und Cytochrom b ₅	6
4. Differenzspektrum der Cannabinoide	7
4.1. Bestimmung der Hemmkonstante K _i	8
5. Ablauf der Versuche unter subchronischer Behandlung	12
6. Statistische Auswertung	13
6.1. Auswertung der Meßergebnisse	13
6.2. Signifikanzberechnung	14
III. <u>Ergebnisse</u>	
1. Die Bindungskonstanten K _s von THC, CBD und CBN	15
2. Die Michaelis-Menten Konstanten K _m für die Demethylierung von Morphin, DMA bzw. die Hydroxylierung von Anilin	15
3. Die Hemmkonstanten K _i von THC, CBD und CBN	17
3.1. Aminopyrindemethylierung	17
3.2. Morphindemethylierung	17
3.3. Anilinhydroxylierung	20

	<u>Seite</u>
4. Wirkung einer subchronischen Behandlung mit THC und CBD	20
5. Die Aktivität der Hydroxylasen und Demethylasen nach subchronischer Behandlung mit THC und CBD	24
5.1. Demethylierung von Aminopyrin und Morphin	24
5.2. Anilinhydroxylierung	24
IV. <u>Diskussion</u>	25
V. <u>Zusammenfassung</u>	29
VI. <u>Literaturverzeichnis</u>	30

I. Einleitung =====

Die weibliche Pflanze des indischen Hanfes, *Cannabis sativa* L., sondert ein harziges Sekret ab, das verschiedene Cannabinoide enthält (29; 32). Der relativ größte Anteil besteht aus Cannabinol, Cannabidiol und delta-9-Tetrahydrocannabinol. In geringeren Mengen sind regelmäßig in dem Harz auch das stereoisomere delta-8-Tetrahydrocannabinol, ferner Cannabigerol, Cannabichromen, Cannabicyclol, Cannabidiolsäure, delta-9-THC-Säure und Cannabinolsäure nachweisbar. Lediglich delta-8-THC und delta-9-THC sind psychoaktiv. Soweit bisher geprüft, werden die Cannabinoide durch die Arzneimittel abbauenden Enzyme der Leber zunächst zu Mono- und Dihydroxylierungsprodukten verstoffwechselt (32; 16; 42; 41). Dabei binden sie sich an die endoplasmatischen Membranen (smooth particles) und bilden einen Enzym-Substrat-Komplex mit Cytochrom P₄₅₀, der durch Spektralveränderungen vom Typ I gemessen werden kann (5; 25; 13). Die Affinität der Cannabinoide zu dem mikrosomalen Monooxygenase-System ist so groß, daß der Stoffwechsel einiger Substanzen, die ebenfalls eine Typ-I-Verbindung eingehen wie z.B. Äthylmorphin, 6-Aminopyrin (9) und Hexobarbital (13; 9) in vitro gehemmt wird. Typ I- und Typ II-Verbindungen unterscheiden sich durch ihre charakteristischen Absorptionsspektren.

In vivo wird der Abbau von Hexobarbital durch delta-9-THC und seinem psychomimetischen Analogon delta-8-THC offenbar nicht wesentlich beeinflusst (5; 35).

Nach CBD ist die Halbwertszeit von Hexobarbital im Blut dagegen deutlich verlängert (13). Paton und Pertwee (34) berichteten, daß CBD auch den Stoffwechsel von Phenazon stärker hemmt als THC. Schließlich wird delta-9-THC und 11-OH-delta-9-THC in Gegenwart von CBD langsamer abgebaut (22)

Zahlreiche Verbindungen, deren Prototyp das Phenobarbital ist, führen zu einer Induktion der Enzyme des Endoplasmatischen

Reticulums (6; 18; 36; 40). Über die Reaktion der arzneimittelentgiftenden Enzyme der Leber nach chronischer Zufuhr von Cannabinoiden ist nur wenig bekannt. Nach zehntägiger Behandlung von Nagetieren mit delta-9- und delta-8-THC (5 mg/kg) wurde keine Änderung der Hexobarbital- und Amphetamin-Halbwertszeit (35) oder der Aktivität der mikrosomalen Enzyme in vitro beobachtet (24). Ho et al. berichteten, daß nach chronischer Gabe (10 mg/kg) über 4 Wochen delta-9-THC schneller verstoffwechselt wird (20). Ähnliche Ergebnisse beobachtete Lemberger (26) beim Menschen. Nach Lemberger et al. scheint sich die Ausscheidungsgeschwindigkeit der THC-Metabolite bei chronischen Marihuana-Konsumenten zu beschleunigen. Die Halbwertszeit sinkt von 56 auf 28 Stunden, ohne daß sich die Verteilung ändert (26).

In der vorliegenden Arbeit wird die Affinität von THC, CBN und CBD zum Cytochrom P₄₅₀ der Lebermikrosomen männlicher Ratten in vitro und der Effekt dieser Cannabinoide auf die mischfunktionelle Oxygenase beim Abbau von Morphin, Aminopyrin und Anilin im akuten Experiment und unter subchronischer Gabe untersucht.

II. Methodik

=====

1. Material

1.1. Tiermaterial

Die Untersuchungen wurden an männlichen Albinoratten, Stamm Wistar (Tierzuchtfarm Hoffmann, Berlin), mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 - 300 g, durchgeführt. Die Tiere erhielten pelletiertes Trockenfutter "Altromin R 10" (Firma Altrogge, Lage-Lippe) und Leitungswasser ad libitum. Für die chronischen Versuche wurden 32 Wistar-Ratten durch Randomisierung in vier Gruppen aufgeteilt.

1.2. Versuchssubstanzen

- a) Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Cannabinol und Cannabidiol wurden aus Hashish, Libanesischen oder Syrischen Ursprungs, in Anlehnung an eine Methode von Aramaki (2) durch mehrfache Säulenchromatographische Behandlung auf Aluminiumoxid-Gel mit Petrol-Äther als Elutionsmittel gewonnen.
- b) Synthetisches delta-8-THC wurde freundlicherweise von Dr. Petrizilka, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt und nach Agurell und Leander (1) auf Kiesel-Gel säulenchromatographisch weitergereinigt. Die in den Versuchen eingesetzten Cannabinoide hatten gaschromatographisch eine Reinheit von mehr als 98,5 %.
- c) 10 %-iges Cremophor EL wurde von Prof. Hoffmeister (Bayer) oder BASF chem. Comp. zur Verfügung gestellt.
- d) Morphiniumchlorid (Fa. Merck); MG 375,85 Dimethylaminoprazon (Fa. Merck); MG 231,30 Anilin (Fa. Merck); MG 93,13

1.3. Applikation

Bei den chronischen Versuchen erhielten die Ratten über 20 Tage 1 mg THC, bzw. CBD/0,2 ml 10 % Cremophorlösung/100 g Körpergewicht und die Kontrolltiere 0,2 ml aqua dest. bzw. Cremophor pro 100 g K.g./Tag i.p. appliziert.

2. Präparation der Lebermikrosomen (in Anlehnung an J.B. Schenkman) (39)

- a) Decapitation männlicher Wistar-Ratten im Kühlraum (4°).
- b) Präparation der Leber.
- c) Zerlegung des Organs in 3 Teile zu je 3 g, etwas zerschneiden und mit der 7-fachen Menge Puffer (Tris-Saccharose pH 7,5) im Glashomogenisator (Potter) homogenisieren, wobei auch die Membranen des Ergastoplasma zerstört werden. Durch differentielle Zentrifugation läßt sich eine Fraktion isolieren, die die Bruchstücke dieser Struktur enthält (Mikrosomenfraktion). In ihr befinden sich außerdem Ribosomen und Lysosomen.
- d) 10' zentrifugieren bei 18200 g, anschließend Überstand absaugen.
- e) 10' zentrifugieren bei 26000 g - Lipidschicht vorsichtig absaugen.
- f) Rest in Spinoröhrchen umfüllen und in einer Beckmann Ultrazentrifuge (L 2 - 65 B) für 60' bei 78000 g (Rotor 30) zentrifugieren - Überstand verwerfen.
- g) Die Rückstände mit je 20 ml Tris-Puffer 0,02 M und KCl 0,15 M versetzen und mit einem Glashomogenisator (Potter) aufwirbeln und waschen.
- h) Erneute Zentrifugation in den Spinoröhrchen 60' bei 78000 g.

Die Mikrosomen enthalten die hydroxylierenden Enzyme (mischfunktionelle Oxygenasen) und auch die Redoxkette, die bei der Hydroxylierung beteiligt ist. Die Mikrosomen können im Tiefkühlfach 7 Tage bei -20°C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Zur jeweiligen Verwendung werden sie aufgetaut und eine Menge, die 3 g Leber entspricht, im Glashomogenisator mit 10 ml Puffer (Tris-0,05 M u. KCl 0,15 M) aufgeschwemmt.

Puffer-Lösungen:

Tris-Puffer: Trishydroxymethylamonimethanlösung: 121,1 g im Meßkolben zu 1 Liter lösen: 1 M

1. Tris-Puffer zum Homogenisieren des Gewebes:

Tris 0,02 M (MG 121,1) - mit 1 n HCl. auf
pH 7,5 einstellen -
u. Saccharose 0,25 M (MG 342,3)

2. Tris-Puffer zum Waschen der Mikrosomen:

Tris 0,02 M - mit 1 n HCl. auf pH 7,5 ein-
stellen -
u. KCl. 0,15 M (MG 74,56)

3. Tris-Puffer zum Suspendieren der Mikrosomen:

Tris 0,05 M - mit 1 n HCl. auf pH 7,5 ein-
stellen -
u. KCl 0,15 M

3. Chemische Bestimmungsmethoden

3.1. Protein

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Mikrosomen erfolgte in Anlehnung an der von Lowry (28) beschriebenen Methode mit Folin's Reagenz. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

Reagenzien:

- a) 2 % Na_2CO_3 in 0,1 NaOH
- b) 1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (1 Teil)
u. 2 % Na-oder K-Tartrat (2 Teile)
- c) Folin's Reagenz mit H_2O 1:2 verdünnt;
- d) Eichlösung: 10 mg Serumalbumin/100 ml H_2O ;

Ansatz:

- 1) 50 ml von Lsg. a) mischen mit 1 ml von Lsg. b).
- 2) 3 Ansätze (0,25; 0,5; 1 ml) der jeweiligen 1:50 verdünnten Mikrosomenlösung mit 1 ml der Mischung aus a) und b) versetzen und 0,1 ml Reagenz c) zugeben.
- 3) Messen der Extinktion (750 nm) nach 45' Photometer Zeiss M 4 Q III in einer 1 cm-Küvette.
- 4) Ablesen der Konzentration an Hand einer Eichkurve, aufgestellt mit Serumalbumin: Lsg. d).
(0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 ml)

3.2. Bestimmung von Cytochrom P_{450} und Cytochrom b_5

Herstellung von Kohlenmonoxyd

Aus einem Meßkolben, der für den Abschluß zur Gasflasche (N_2) nach oben geöffnet ist, wird tropfenweise Ameisensäure 98 % - 100 % in einen Kolben, in dem sich konzentrierte Schwefelsäure befindet (95 % - 97 %) zugegeben. Dabei bildet sich hauptsächlich CO . Das Gas wird zur Reinigung über ein Verbindungssystem (Plastikschläuche) durch 2 Waschflaschen geleitet. Die erste enthält eine Lösung aus 50 %-iger KOH, die zweite 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /125 ml H_2O und 20 ml 70 %-iger KOH. Von der zweiten Waschflasche perlt durch eine Kapillare das sich entwickelnde CO -Gas direkt in den Küvetteninhalt.

Bei der Bestimmung des Cytochrom P_{450} u. b_5 wurde nach der von Omura und Sato (33) beschriebenen Methode wie folgt verfahren:

a) Cyt. b_5 -Bestimmung

In 2 Küvetten von 1 cm Schichtdicke werden je 2,5 ml der 1:2 verdünnten Mikrosomensuspension (bestehend aus Mikrosomen von 3 g Leber/15 ml Puffer) pipettiert und die Basislinie im Bereich von 350 - 500 nm am Beckmann Ratio-recording-Spektralphotometer DK 2 registriert. Nach Zusatz von NADH (5 μ l einer Lösung 20 mg/ml) in die Probenküvette wird ein Absorptionsspektrum geschrieben und ΔE zwischen 424 und 409 nm gemessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz $E = \epsilon \times c \times d$ läßt sich auf diese Weise der Gehalt an Cyt. b_5 errechnen (Abb. 1).

$$\epsilon = 170 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \text{ (nach Omura u. Sato) (33)}$$

c = Konzentration d = Schichtdicke.

b) Cyt. P_{450} -Bestimmung

Nach Reduktion des Inhalts beider Küvetten mit Dithionit wird die Probenküvette mit CO begast (1 min.) und erneut ein Absorptionsspektrum geschrieben. ΔE wird gemessen zwischen 450 u. 490 nm. Die Auswertung der Kurve erfolgte wie unter a). (Abb. 1) $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (nach Omura u. Sato) (33)

4. Differenzspektrum der Cannabinoide

- 1) Aufarbeiten der Mikrosomenpräparation
- 2) Je 2,5 ml der Suspension in 3 ml-Küvetten füllen
- 3) Zugabe (2; 5; 8; 15; 20 Mikroliter) von Cannabinoiden (THC, CBD, CBN) 12,5 mg C./7,94 ml Äthanol in aufsteigender Reihe (4; 10; 16; 20; 30; 40 μ M) in eine der beiden Küvetten. Eine äquivalente Menge Äthanol enthielt die Vergleichsküvette.

4) Aufnahme eines Spektrums mit Hilfe eines Beckmann DK-2A Ratio Recording Spectrophonometer zwischen 350 und 500 nm.

5) Auswertung:

Die Differenz aus den Abständen der Maxima zur Nulllinie minus denen der Minima zur Nulllinie ist ein Maß für die hier gemessene Transmission, aus der durch Umrechnung die Absorption (ΔE) bestimmt wird:

$$E = \log \frac{100}{\%T} = 2 - \log T$$

Aus dem Lineweaver-Burk Diagramm läßt sich die Größe der spektralen Dissoziationskonstante K_s des Enzym-Substrat-komplexes ermitteln, indem die Reziprokwerte von ΔE gegen die Substratkonzentration $1/S$ aufgetragen werden.

4.1. Bestimmung der Hemmkonstante K_i

a) u. b) Demethylase (Abbau von Morphin und Dimethylaminophe-
nazon)

Bestimmt wurde die Formaldehydkonzentration mit Nash's Reagenz B (30). Die Ermittlung der Hemmkonstanten (Demethylase- und Hydroxylase-Versuch) erfolgte nach der von Schenkman et al. (39) angegebenen Methode, bei der im einzelnen wie folgt vorgegangen wird:

Inkubationsansatz:

I. 0,2 ml NADP 0,4 mM

0,2 ml $MgCl_2 \times 6 H_2O$ 5 mM

0,2 ml Glucose-6-phosphat 4 mM

0,2 ml Semicarbazid 37,5 μM = 5,00 mg/40 ml
(einstellen auf pH 7,5)

0,1 ml Glucose-6-phosphatdehydrogenase
(Boehringer-Mannheim pur. Grad II)

0,1 ml Tris 0,05 M - KCl. 0,15 M (pH 7,5)

II. 1,0 ml Morphiniumhydrochlorid (absteigende Konzentrationsreihe: 2; 1; 0,5; 0,33; 0,2 mM) gelöst in Tris-Puffer 0,05 M respective dasselbe für DMA.

III. 1,0 ml Mikrosomensuspension (entsprechen 3 g Leber auf 10 ml Puffer Tris 0,05 M und 0,15 M KCl).

IV. 1,0 ml 10 %-ige Trichloressigsäure

Zunächst werden Lösungen I. und II. (ohne Mikrosomen) 15' - 20' im Schüttelbad bei 37° C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von je 1 ml Mikrosomensuspension (III) - 1 - 1,5 mg Protein/ml - plus 1 µl THC (37,6 mg)/ml Äth. = 40 µM oder 1 µl CBD (37,6 mg)/ml Äth. = 40 µM bzw. 1 µl CBN (37,3 mg)/ml Äth. = 40 µM in aufsteigender Reihe von 0 µM (nur Äth.) über 5; 10; 40; bis zu 80 µM.

Nach 15'-iger Inkubation wird die Reaktion mit 1 ml 10 %-iger Trichloressigsäure (IV) gestoppt und der Ansatz bei 26000 g zentrifugiert. 1,5 ml des Überstandes werden in ein Reagenzglas pipettiert und auf 3 ml mit Nash's Reagenz (30) aufgefüllt. Darauf erfolgt erneute Inkubation bei 58° C, 10 Minuten, an die sich die Messung der Extinktion in einer 3 ml Küvette (Schichtdicke: 1 cm) im Photometer bei einer Wellenlänge von 412 nm anschließt.

Für die Eichreihe wurde Formaldehydlösung 35 Gew. % (Firma Merck) verwendet (MG 30,03).

Puffergemisch: 10 %-ige Trichloressigsäure, Tris 0,05 M
- KCl 0,15 M und Semicarbacid.

Es wurden 3 Lösungen von der Molarität 0,01; 0,03; 0,05 mM erstellt.

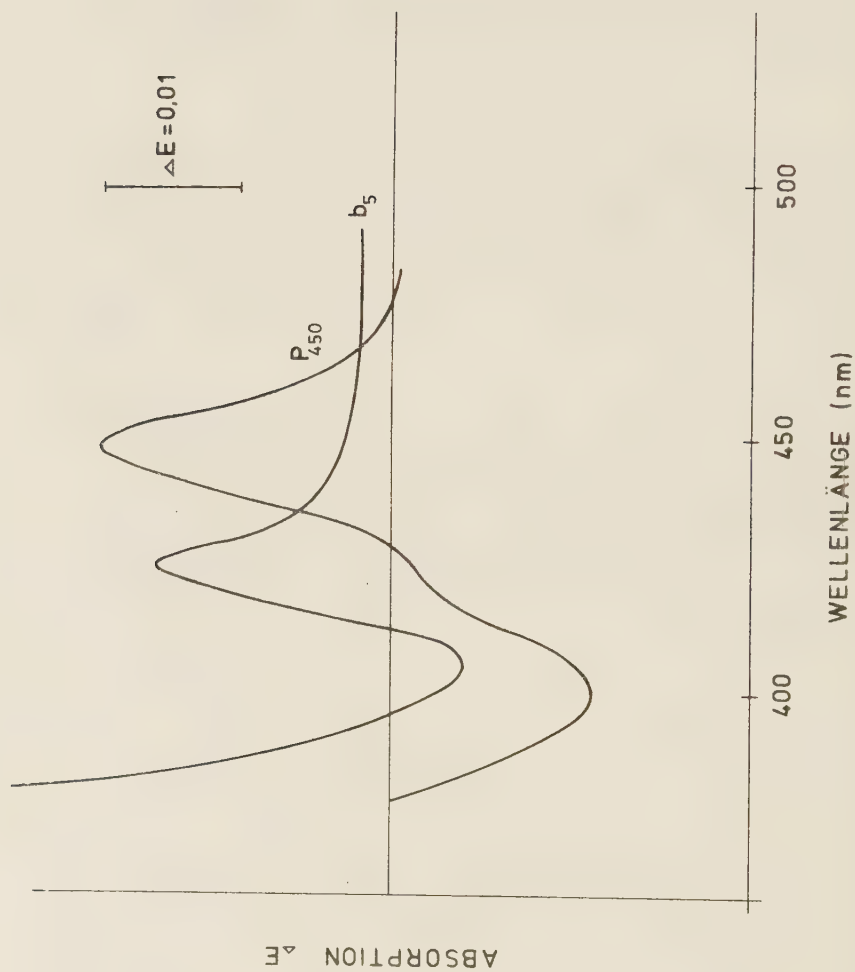


Abb1 Bestimmung von Cytochrom P_{450} und b_5

Auswertung:

Die Berechnung der Hemmkonstanten K_i erfolgte nach der Formel (5):

$$K_i = \frac{I}{\frac{v_{\max}}{K_m} \times \frac{K'_m}{v'_{\max}}} - 1$$

I = Konz. an Cannabinoiden (Inhibitor)

$v_{\max}$ u. $v'_{\max}$ = Maximalgeschwindigkeiten bei dem Versuch ohne - respective mit (') Hemmung.

K_m u. K'_m = die entsprechenden Michaelis-Menten Konstanten.

c) Hydroxylase (Abbau von Anilin):

Gemessen wurde die p-Aminophenolkonzentration. Der Versuchsablauf entsprach im wesentlichen dem der Demethylase-reaktion.

- 1) Anilin 2 mM (gelöst in Tris - Puffer 0,05 M - ohne KCl)
- 2) Zugabe der Mikrosomen und Cannabinoide (5; 10; 40; 200 μ M)
- 3) 20' Inkubation
- 4) Stoppen der Reaktion mit 1,5 ml 20 %-iger Trichloressigsäure/3 ml Inkubationsansatz
- 5) Zentrifugieren
- 6) 1 ml des Supernatant mischen mit 1 ml NaOH (0,5 M), gelöst in 1 %-igem Phenol.
- 7) Zugabe von 1 ml Na_2CO_3 (1 M)
- 8) 40' Inkubation bei Raumtemperatur
- 9) Messen der Extinktion bei 630 nm

Eichkurve für die Anilinhydroxylase:

Für die Eichreihe wurde p-Aminophenol (Fa. Merck) (MG 109,13) verwendet, das in einem Puffergemisch (20 %-ige Trichloressigsäure, Tris 0,05 M - KCl 0,15 M und Semicarbazid) gelöst war und drei Lösungen erstellt von der Molarität: 0,01; 0,03; 0,05 mM.

5. Ablauf der Versuche unter subchronischer Behandlung

In gleicher Weise, wie unter 4. beschrieben, war die Versuchsreihe (Doppelversuche) mit den chron. vorbehandelten Tieren angelegt: 4 Gruppen mit je 4 Tieren wurden wie folgt behandelt:

Die stark lipoidlöslichen Cannabinoide und das synthetische THC müssen mit Hilfe von Lösungsvermittlern appliziert werden. Hierzu wurde eine 10 %-ige Lösung von Cremophor EL (Reaktionsprodukt zwischen Äthylenoxid und Rizinusöl) gewählt. Dieser Lösungsvermittler ist nach Angaben von Prof. Hoffmeister (Bayer AG., Wuppertal) in bis zu 15 %-iger Lösung parenteral chron. ungiftig. Um dennoch eventuelle Effekte des Lösungsvermittlers erkennen zu können, war es nötig, auch Kontrolltiere, die nur aqua dest. bekamen, zu halten. Daher resultieren 4 Gruppen von Versuchstieren:

- 1) Wasser - Kontrollen = 0,2 ml aqua dest./100 g Körpergewicht/
Tag
- 2) Cremophorkontrollen = 0,2 ml 10 %-ige Cremophorlösung/
100 g Körpergewicht/Tag
- 3) Synthetisches THC standardisiert auf 1 mg/100 g K.gew./Tag
in 0,2 ml 10 %-iger Cremophorlösung.
- 4) Cannabidiol standardisiert auf 1 mg/100 g K.gew./Tag in
0,2 ml 10 %-iger Cremophorlösung

Am Morgen nach dem letzten Tag der Applikation wurden die

Tiere decapitiert und die Mikrosomen - wie oben beschrieben - aufgearbeitet.

6. Statistische Auswertung

6.1. Auswertung der Meßergebnisse

Die Darstellung der Unterschiede der einzelnen Meßergebnisse zwischen den behandelten Tieren erfolgte durch die einfaktorielle Varianzanalyse, wie sie Campbell (4) in seinem Buch "Statistische Methoden für Biologen und Mediziner" angegeben hat.

Im einzelnen sind dazu folgende vorbereitende Schritte - bezogen auf den allgemeinen Fall - notwendig:

Versuchsgruppen	1	2	3	p	Summe
Anzahl der Versuche:	n_i	n_1	n_2	$n_3 \dots n_p$	$n = n_i$

Gesamtsumme der					
Meßergebnisse:	T_i	T_1	T_2	$T_3 \dots T_p$	$T = T_i$

Teilsumme aus den					
Stichproben:	S_i	S_1	S_2	$S_3 \dots S_p$	$S = S_i$

Gesamtsumme in einer

Behandlungsgruppe

dividiert durch die	$\frac{T_i^2}{n_i}$	$\frac{T_1^2}{n_1}$	$\frac{T_2^2}{n_2}$	$\frac{T_3^2}{n_3} \dots \frac{T_p^2}{n_p}$	$\frac{T^2}{n}$
Zahl der Beobachtungen in dieser Gruppe.					

Durch den F-Test wird eine Antwort auf die Frage nach der Gleichheit aller Mittelwerte gegeben.

Die einfaktorielle Varianzanalyse für eine Gesamtzahl von n Beobachtungen über p Stufen:

Variations- ursache	Quadrat- summe	Frei- heits- grade	Mitt- lere quadrat. Abweichg.	Varianz- verhält- nis
	(QS)	(FG)	(s ²)	(F)
Quadratsumme zwischen den Behandlung- stufen	$\frac{T_i^2}{n_i} - \frac{T^2}{n}$	p-1	$\frac{QS}{FG}$	$\frac{s^2 \text{ zw. Stufe}}{\text{Restvarianz}}$
Rest- quadratsumme =	Gesamtqua- dratsumme minus Qua- dratsumme zw. d. Stufen	n-p	$\frac{QS}{FG}$	

6.2. Signifikanzberechnung

Um zu entscheiden, ob die Unterschiede zwischen den Grundgesamtheiten signifikant sind, wird der berechnete F-Wert verglichen mit Werten in einer für Überschreitungswahrscheinlichkeiten von 5,1 und 0,1 Prozent nach Campbell erstellten Tabelle. Dabei werden die Schwellenwerte bei (p-1) Freiheitsgraden in einer Spalte und (n-p) Freiheitsgraden in einer Zeile aufgesucht. Liegen die errechneten F-Werte über denen in der Tabelle auf dem jeweiligen Prozentniveau gefundenen, liegt eine signifikante Abweichung vor.

III. Ergebnisse

=====

1. Die Bindungskonstanten K_s von THC, CBD und CBN

Delta-9-Tetrahydrocannabinol, Cannabiol und Cannabidiol (4 - 40 μM) binden sich wie zahlreiche andere Pharmaka, die in der Leber oxydativ verstoffwechselt werden, an die Arzneimittel entgiftenden Enzyme des endoplasmatischen Retikulums. Durch die Bindung der Cannabinoide an Cytochrom P_{450} wird dessen Spektrum verändert. Im Vergleich zum Spektrum von Mikrosomen ohne Zusatz von Pharmaka treten bei Typ I-Bindern charakteristische Maxima und Minima auf. In Übereinstimmung mit Befunden von Cohen et al. sowie Kupfer et al. liegen die Maxima zwischen 388 und 392 nm, die Minima zwischen 419 und 422 nm (s. Abb. 2). Bei gleicher Proteinkonzentration haben THC, CBD und CBN annähernd ein gleiches großes ΔE_{max} . (390 - 420 nm). Demgegenüber sind die Dissoziationskonstanten K_s (nach dem Massenwirkungsgesetz der Quotient aus $\frac{E \times S}{ES} = K_s$) keineswegs gleich. Aus den Berechnungen nach Lineweaver Burk betragen sie für CBN: 46 μM ; für delta-9-THC: 42 μM ; für delta-8-THC: 37 μM ; für CBD jedoch ist K_s mit 11,2 μM deutlich niedriger. Demzufolge hat CBD zu Cytochrom P_{450} eine 3 bis 4 mal höhere Affinität als die anderen Cannabinoide.

2. Die Michaelis - Menten Konstanten K_m für die Demethylierung von Morphin, DMA bzw. die Hydroxylierung von Anilin

Die Michaelis - Menten Konstante K_m , d.h. die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{\text{max}}/2$), beträgt für die Aminopyrindemethylierung $K_m = 510 \pm 80 \mu\text{M}$ (12) für die Morphindemethylierung $K_m = 400 \pm 70 \mu\text{M}$ (12) und für die Anilinhydroxylierung $K_m = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (9).
(In Klammern die Anzahl der Versuche.)

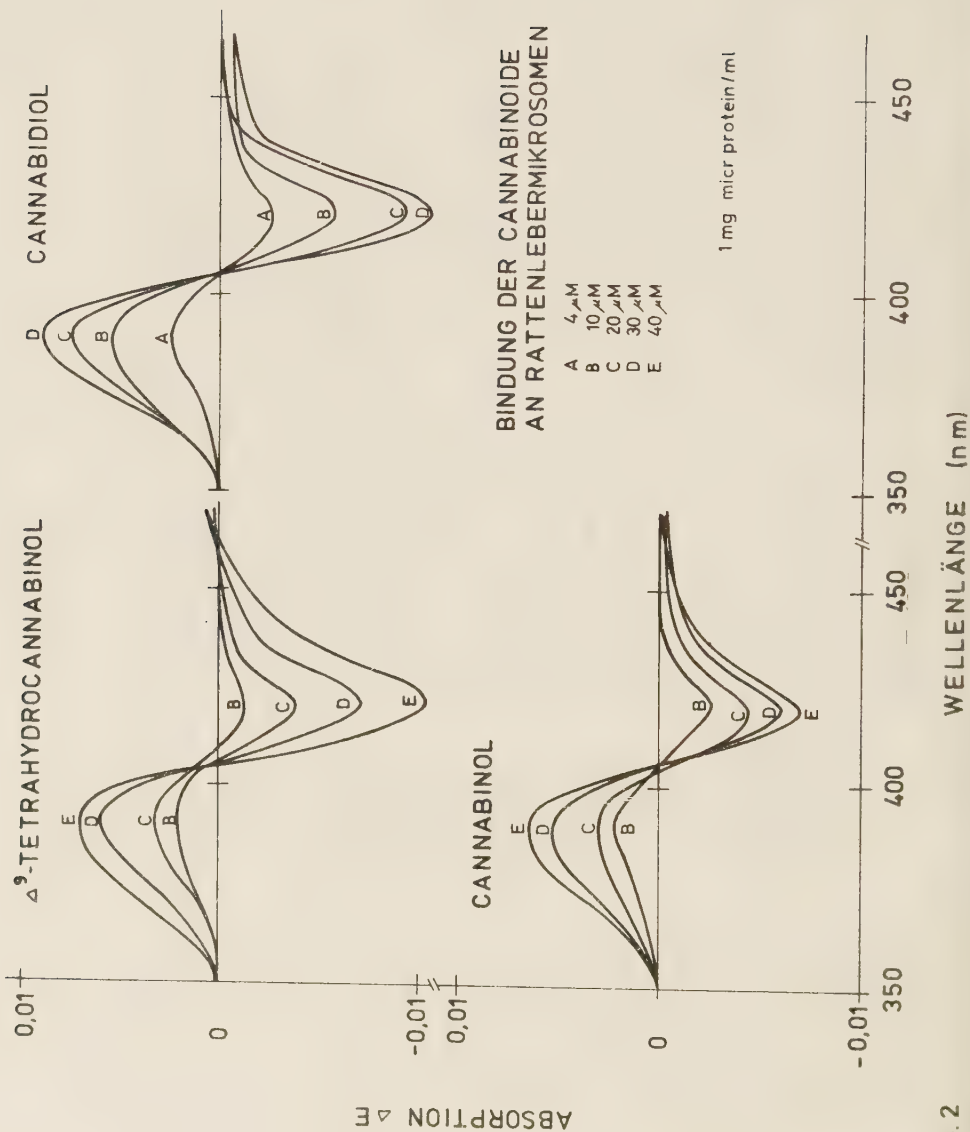


Abb. 2

3. Die Hemmkonstanten K_i von THC, CBD und CBN

3.1. Aminopyrindemethylierung

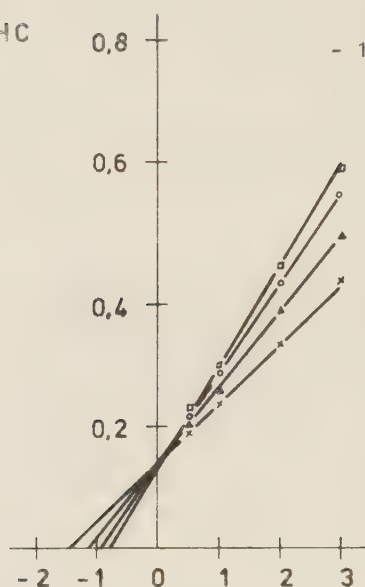
Vorversuche ergaben, daß Äthanol im Demethylase- und Methanol im Hydroxyglase-Versuch (s. u.) als Lösungsvermittler für die wasserunlöslichen Cannabinoide die Reaktion nicht beeinflussen. Delta-9-THC, delta-8-THC und CBN hemmen die Formaldehydbildung beim Abbau von DMA durch die Mikrosomen kompetitiv bei einer Konzentration von 5 - 80 μM (s. Abb. 3). Die Hemmkonstanten (s. Tab. I) lagen wie die Dissoziationskonstanten in derselben Größenordnung (10^{-5} M) und unterschieden sich nicht wesentlich voneinander: FG. 2; 13; $F = 1,97$; $p < 0,05$.

Bei einem Vergleich der Hemmkonstanten zwischen den Cannabinoiden zeigt sich die starke Wirksamkeit von CBD. Die Hemmkonstante von CBD bei einer Konzentration von 5 μM ist 10 mal kleiner als die der anderen Cannabinoide (s. Tab. I). Bis zu einer Konzentration an CBD von 10 μM war die Hemmung kompetitiv. Bei einer Konzentration von 40 μM kam es zu einem "gemischten" Hemmtyp (s. Abb. 3).

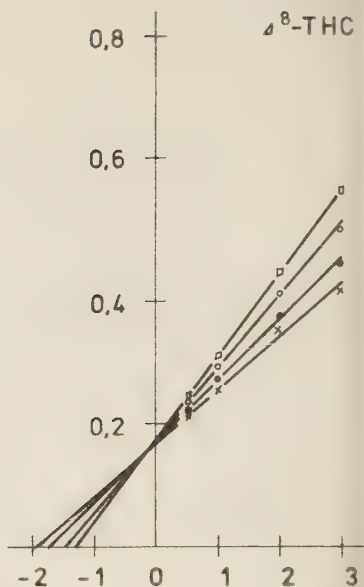
3.2. Morphindemethylierung

Die Wirkungen der Cannabinoide auf die Demethylierung von Morphin entsprechen in etwa denen bei der Aminopyrindemethylierung (s. Tab. I).

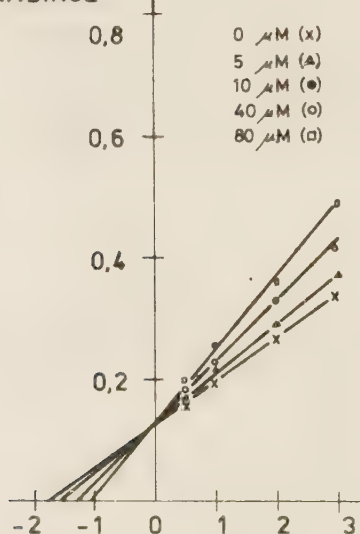
Überraschenderweise zeigte sich jedoch bei der Zugabe von delta-8-THC keine Wirkung auf den Abbau des Morphins (s. Abb. 4). Bei der Hemmung durch Cannabinol in allen Konzentrationen und durch delta-9-THC in Konzentrationen $< 80 \mu\text{M}$ handelte es sich um eine kompetitive Hemmung, während, ähnlich wie bei der Demethylierung von Aminopyrin, CBD den Abbau von Morphin bei Konzentrationen $< 5 \mu\text{M}$ in "gemischter" Form hemmte (s. Abb. 4). Ungeachtet dessen stimmen die Hemmkonstanten von

Δ^9 -THC

- 18 -

 Δ^8 -THC

CANNABINOL



CANNABIDIOL

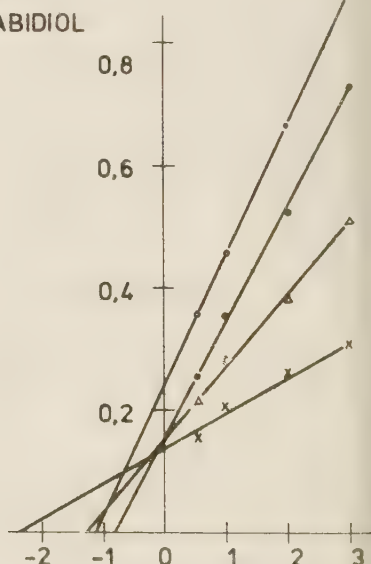


Abb. 3 : Lineweaver-Burk Diagramme zeigen die Hemmung der Aminopyrindemethylierung durch Δ^9 -THC, CBN und CBD.

Ordinate: 1/nmol HCHO/min/mg mikrosomales Protein
 Abscisse: $1/S \times 10^{-3} M$

	Delta-9-THC	Delta-8-THC	Cannabinol	Cannabidiol	Varianzanalyse
Max. Extinktions-Differenz (390-420nm) = $\Delta E_{\max}$	0,028 $\pm$ 0,02 (5)	0,025 $\pm$ 0,06 (5)	0,029 $\pm$ 0,04 (4)	0,030 $\pm$ 0,05 (5)	FG.3;15 F=1,10 n.s.
Prot. Konz. 1 mg/ml					
Spektal Dissoziations- konstante K_S (μM)	41,6 $\pm$ 7,2 (5)	37,0 $\pm$ 4,2 (5)	46,1 $\pm$ 6,4 (5)	11,2 $\pm$ 1,4 (5)	FG.3;16 F=42,4 p < 0,001
Hemmkonstante: Aminopyrin- demethylierung K_i (μM)	58 $\pm$ 11" (6)	80 $\pm$ 14" (4)	68 $\pm$ 22 " (6)	4,9 $\pm$ 0,8 = (6)	FG.3;18 F=29,5 p < 0,001
Hemmkonstante: Morphin- demethylierung K_i (μM)	68 $\pm$ 36" (6)	keine Hemmung bis 80 μM	52 $\pm$ 8" (6)	4,7 $\pm$ 2,7 = (6)	FG.2;15 F=14,26 p < 0,001
Wirkung auf die Anilin- hydroxylierung	keine Hemmung bis 200 μM	keine Hemmung bis 200 μM	keine Hemmung bis 200 μM	keine Hemmung bis 200 μM	

Die Wirkungen der Cannabinoide auf das Arzneimitteilstoffwechselsystem der Leber
In Klammern die Anzahl der Experimente

= Die Hemmkonstante wurde bei 40 μM bestimmt

! Es handelt sich hier nicht um die wahre Hemmkonstante, da $v_{\max}$ von der CBD-Reaktion wesentlich

(p < 0,05) vom Kontrollwert abweicht.

delta-9-THC, CBN und CBD bei der Morphindemethylierung mit denen im Zusammenhang der Aminopyrindemethylierung ermittelten gut überein. Sowohl bei der Aminopyrindemethylierung wie auch der Morphindemethylierung ist Cannabidiol das am stärksten hemmende Cannabinoid.

3.3. Anilinhydroxylierung

In dieser Versuchsreihe war durch THC, CBD und CBN bis zu einer Konzentration von 200 μ M keine Hemmung der Anilinhydroxylierung nachzuweisen (s. Tab. I).

4. Wirkung einer subchronischen Behandlung mit THC und CBD

Die Tiere nahmen bei den Versuchen über 20 Tage nach CBD durchschnittlich um 21 g, nach THC um 15 g an Gewicht zu. Dies ist mehr als bei den Kontrolltieren (durchschnittlich 13 g). Die Lebergewichte verhielten sich im Vergleich untereinander offensichtlich konstant, da alle Tiere ein durchschnittliches Lebergewicht von 9 g aufwiesen, respective 10 g bei der zweiten Gruppe.

a) Proteingehalt

Der Proteingehalt der Mikrosomen (mg/g Lebergewicht) änderte sich während 20-tägiger Behandlung weder durch THC noch CBN (s. Tab. II).

b) Cytochrom P₄₅₀ u. b₅

Der mikrosomale Gehalt an Cyt. P₄₅₀ u. Cyt. b₅ wird durch THC ebenfalls nicht beeinflusst. Dagegen erhöht sich nach Gabe von Cannabidiol sowohl der Gehalt an Cyt. b₅ als auch der an Cyt. P₄₅₀ (s. Tab. II) gering.

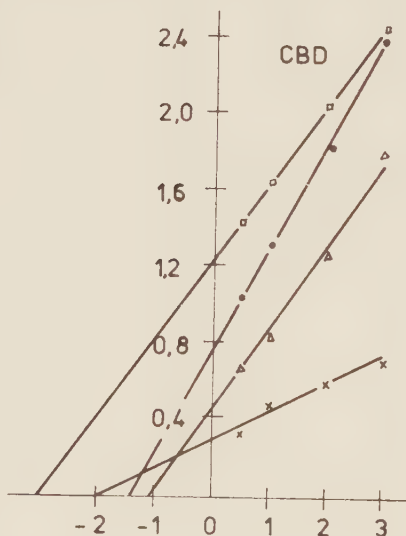
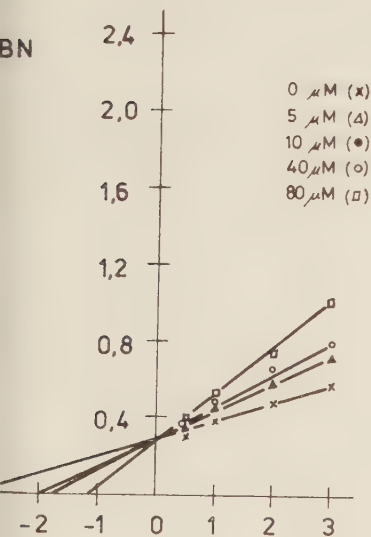
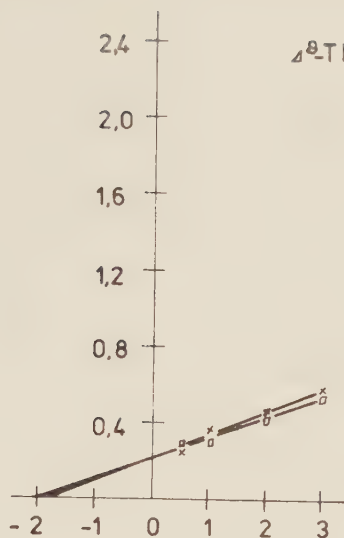
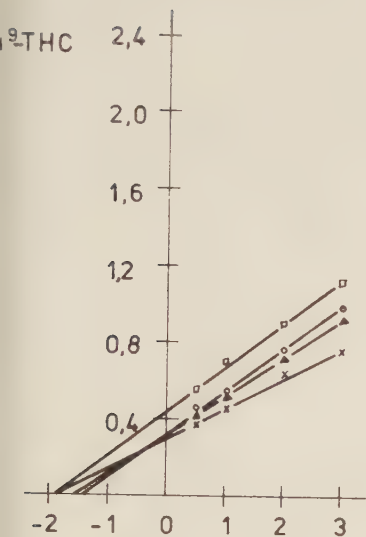


Abb. 4 : Die Lineweaver-Burk Diagramme zeigen die Hemmung der Morphin demethylierung durch delta-9-THC, CBM und CBD.

Ordinate: $1/\text{nmol HCHO}/\text{min}/\text{mg}$ mikrosomales Protein
 Abscisse: $1/S \times 10^{-3}$.

Tabelle II

	H ₂ O-Kontrolle	10 %-ige cremo- phor-Kontrolle	Delta-9-THC	Cannabidiol	Varianzanalyse
mikrosomales Protein (mg/g Leber)	19,5 ± 2,0	18,3 ± 1,5	17,0 ± 1,8	17,7 ± 2,2	
Cyt. P ₄₅₀ (nmol/g Leber)	12,4 ± 0,9	11,5 ± 1,0	12,3 ± 0,9	13,4 ± 1,1 ^x	FG. 3; 18 F=2,62 n.s.
Cyt. P ₄₅₀ (nmol/mg Protein)	0,61 ± 0,11	0,64 ± 0,07	0,72 ± 0,08	0,76 ± 0,06 ^x	FG. 3; 19 F=2,45 p < 0,05
Cyt b ₅ (nmol/g Leber)	15,0 ± 1,6	14,5 ± 0,6	15,2 ± 0,8	17,1 ± 1,2 ^{xx}	FG. 3; 19 F=5,42 p < 0,01
Cyt b ₅ (nmol/mg Protein)	0,78 ± 0,09	0,80 ± 0,08	0,91 ± 0,12	0,99 ± 0,16 ^x	FG. 3; 19 F=4,02 p < 0,05

Die Wirkung auf den mikrosomalen Protein- und Cytochrom P₄₅₀/b₅-spiegel der Leber nach Applikation von delta-9-THC bzw. CBD (10 mg/kg/Tag i.p.) über 20 Tage. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet und die Mikrosomen aus der Leber präpariert.

x p < 0,05; xx p < 0,01;

Tabelle III

Substrat	H ₂ O-Kontrolle	10 %-ige cremo- phor-Kontrolle	Delta-9-THC	Cannabidiol	Varianzanalyse
$K_m (10^{-4} M)$	$4,1 \pm 0,8$	$3,9 \pm 0,9$	$4,6 \pm 0,5$	$5,4 \pm 1,7$	
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$	$6,9 \pm 1,5$	$5,9 \pm 0,9$	$6,8 \pm 1,5$	$4,7 \pm 1,1$	FG. 3; 19 F=11,11 p < 0,001
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/mg mikr. Prot.					
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/nmol Cyt. P ₄₅₀	$10,2 \pm 2,1$	$8,9 \pm 2,1$	$9,3 \pm 2,0$	$6,1 \pm 1,2^x$	FG. 3; 19 F=12,25 p < 0,001
$K_m (10^{-4} M)$	$3,0 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,8$	
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$	$3,1 \pm 0,6$	$2,8 \pm 1,0$	$2,8 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,3^{xx}$	FG. 3; 20 F= 9,19 p < 0,001
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/mg mikr. Prot.					
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/nmol Cyt. P ₄₅₀	$5,0 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,8$	$3,9 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,3^{xxx}$	FG. 3; 20 F=9,81 p < 0,001
$K_m (10^{-4} M)$	$0,039 \pm 0,009$	$0,036 \pm 0,011$	$0,032 \pm 0,008$	$0,037 \pm 0,007$	
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	FG. 3; 19 F=1,91 n.s.
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/mg mikr. Prot.					
$v_{\max} (\text{min}^{-1})$ nmol/nmol Cyt. P ₄₅₀	$1,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$	FG. 3; 19 F=2,59 n.s.

Die Wirkung auf die Aminopyrin- und Morphindemethylierung sowie Anilinhydroxylierung nach Applikation (20 Tage) von delta-9-THC bzw. CBD (10 mg/kg/Tag i.p.). Die Tiere wurden 24 Stunden nach der letzten Injektion getötet und die Mikrosomen präpariert.

x p < 0,05; xx p < 0,01; xxx p < 0,001;

5. Die Aktivität der Hydroxylasen und Demethylasen nach subchronischer Behandlung mit THC und CBD

5.1. Demethylierung von Aminopyrin und Morphin

Die mit H_2O , Cremophor, respective mit delta-9-THC chron. vorbehandelten Tiere unterschieden sich nicht bezüglich ihres Einflusses auf die Aktivität der Demethylase (s. Tab. III). Nach Cannabidiol-Behandlung fiel V_{max} sowohl der N-Demethylierung von Aminopyrin als auch von Morphin statistisch signifikant ab. Dies unterstützt die Annahme, daß CBD im Hinblick auf beide Demethylierungsreaktionen verantwortlich ist für die Veränderungen, die sich auch bei den über 9 Monate mit Cannabis behandelten Tieren zeigte (22).

5.2. Anilinhydroxylierung

Weder bei den mit delta-9-THC noch mit CBD vorbehandelten Tieren war die Aktivität der Hydroxylase verändert. Dieses Ergebnis stimmt mit den in vitro ermittelten Experimenten, bei denen Konzentrationen bis zu 0,2 mM an delta-9-THC, CBN und CBD verwendet wurden, s. o., überein.

IV. Diskussion

=====

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß die Cannabinoide THC, CBD und CBN mit den mischfunktionellen Oxygenasen im endoplasmatischen Reticulum der Leber reagieren. Die dabei entstehenden Bindungsspektren entsprechen dem Typ I. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Kupfer et al. beschriebenen überein (25). Darüberhinaus sind die untersuchten Cannabinoide in unterschiedlicher Intensität auch Hemmstoffe des Abbaus anderer Pharmaka vom Bindungstyp I, die durch die mikrosomalen Enzyme entgiftet werden. Die Aminopyrindemethylierung wird besonders stark durch Cannabidiol gehemmt. Cannabinol und delta-9-Tetrahydrocannabinol sind weniger wirksam. Fernandes et al. fanden das gleiche Verhalten der Cannabinoide gegenüber der Seitenkettenoxydation von Hexobarbital, einem anderen Typ I-Binder (13). Die Demethylierung von Morphin wird in ähnlicher Weise beeinträchtigt. Allerdings war bei diesem Substrat delta-8-THC bis zu einer Konzentration von 80 μM völlig wirkungslos. Durch Cannabidiol wird sie in allen Konzentrationen (5; 10; 40; 80 μM) gemischt - kompetitiv, nicht kompetitiv - gehemmt.

Demgegenüber wird die Hydroxylierung von Anilin, einem ausgesprochenen Typ II-Binder, durch die Cannabinoide auch in Konzentrationen bis zu 200 μM nicht beeinflußt. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Cohen (5) fand z.B. keine Hemmung von p-chloro-N-methylamine durch delta-9-THC.

Über die Bestätigung dieser prinzipiell schon bekannten Wechselbeziehung zwischem dem mikrosomalen Oxygenasesystem der Leber und einzelnen Cannabinoiden hinaus, konnte als wichtiges neues Ergebnis der vorliegenden Untersuchung die starke Wirksamkeit des CBD herausgearbeitet werden. Mit Ausnahme des antikonvulsiven Effekts (27) gilt CBD pharmakologisch als weitgehend inaktiv. Nun stellt sich heraus, daß CBD ein wesentlich stärkerer Hemmstoff des arzneimitteloxydierenden Systems

ist als die anderen Cannabinoide, einschließlich des psychomimetischen delta-8-THC und delta-9-THC. Auf Grund der errechneten spektralen Dissoziationskonstanten K_s hat CBD eine vier mal höhere Affinität zum Enzym als CBN, delta-8-THC oder delta-9-THC. Eine noch größere Differenz zwischen Cannabidiol und CBN bzw. delta-8-THC und delta-9-THC besteht in den Hemmkonstanten K_i bei der Aminopyrin- und Morphindemethylierung. Bei der Hemmung dieser Reaktion ist CBD im Vergleich zum CBN, delta-8-THC und delta-9-THC zehnmal wirksamer.

Die Lineweaver-Burk-Diagramme weisen darauf hin, daß nicht nur die Konkurrenz an der gemeinsamen Substratbindungsstelle (competitive Hemmung) für den Hemmeffekt von Cannabidiol von Bedeutung ist. Vielmehr beobachtet man bei höheren Konzentrationen von CBD auch einen nicht - competitiven Effekt. Gilette et al. beobachteten 1969 (17) nach höheren Konzentrationen an DPEA ($4 \mu\text{M}$) - 2,4 - dichloro-6-phenylphenoxäthylamin - einen Wechsel im Hemmtyp von nicht-competitiv zu competitiv bei der N-Demethylierung von Äthylmorphin. Eine solche Abhängigkeit des Hemmtypes von der Konzentration des Hemmstoffes wurde auch für Metyrapon, einem starken Inhibitor für Cytochrom P₄₅₀ abhängige Reaktionen, in Rattenlebermikrosomen gefunden (Roots u. Hildebrandt, 38). Metyrapon bindet sich mit hoher Affinität ($K_i = 2 \mu\text{M}$) an das Häm-Eisen des Cytochrom P₄₅₀ und competiert mit dem Sauerstoff, wodurch der nicht-competitive Hemmtyp erklärt werden kann.

Mit geringerer Affinität findet aber auch eine Bindung an die Substratbindungsstelle statt. Dies zeigt sich in dem competitiven Hemmtyp bei höheren Metyrapon-Konzentrationen (Netter, 31).

Weitere Untersuchungen müßten zeigen, ob auch für das Cannabidiol ähnliche Mechanismen angenommen werden können. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann erwartet werden, daß CBD mit relativ hoher Affinität an die Substratbindungsstelle gebunden wird und mit relativ niedriger Affinität an das Häm-Eisen.

Von praktischerem Interesse als die Wechselbeziehungen in vitro ist jedoch die Frage, in wieweit die Cannabinoide die Aktivität der Demethylasen und der Hydroxylasen in vivo beeinflussen. Fernandes et al. fanden, daß nach i.p. Applikation von CBD die Elimination des Barbiturats in vivo langsamer verläuft (14). Eine Stunde nach einer Zufuhr von 10 mg/kg CBD betrug die Halbwertszeit des Hexobarbitals 40 Min., die der Kontrollen dagegen nur 20 Minuten. Dieser Effekt konnte auch noch 48 Std. nach der CBD-Injektion beobachtet werden. Demgegenüber wird der Hexobarbital-Metabolismus in vivo durch delta-9-THC und CBN bis zu einer Konzentration von 40 mg/kg nicht beeinflusst. Coper und Fernandes berichteten (7, 8), daß nach Gabe von Cannabis-Extrakten (20 % THC; 18 % CBN; 40 % CBD) die Morphintoxizität sich dosisabhängig erheblich verstärkt. Auch der Stoffwechsel des psychomimetisch wirksamen delta-9-THC ist in vivo bei der Maus durch CBD gehemmt (22). Damit wird die erhöhte Wirksamkeit von THC bei gleichzeitiger Gabe von CBD verständlich.

Diese Befunde werden bestätigt und ergänzt durch die Experimente nach subchronischer Gabe von THC und CBD. Nur an den mit CBD behandelten Tieren war eine Vermehrung der Cytochrome P_{450} u. b_5 nachzuweisen. Obwohl dieser leichte Anstieg auf eine geringe Induktion durch das CBD hinweist, ist V_{max} der Demethylierung von Aminopyrin und Morphin trotzdem vermindert, wenn die Tiere am anderen Morgen, nachdem die Cannabinoidapplikation beendet war, getötet wurden. Fernandes berichtet, daß 8 Tage nach Beendigung der chronischen Behandlung mit einem Cannabis-Extrakt die "Hemmechanismen" aufgehoben waren, der Gehalt an Cyt. P_{450} u. b_5 um 10 - 15 % jedoch erhöht blieb (15). Der Effekt läßt sich durch die starke Lipophilie der Cannabinoide oder deren metabolischen Produkte erklären. Daher enthält nach Absetzen der Behandlung die mikrosomale Präparation sowohl der sofort getöteten Tiere wie auch die der nach 24 h geschlachteten Tiere - wie in dieser Arbeit - eine beträchtliche Menge an Cannabinoiden oder deren Metabolite. Das Verbleiben der Cannabinoide in den Mikrosomen kann damit

erklärt werden, daß sie eine feste Bindung eingehen und sich nur schwer "herauswaschen" lassen. Von Experimenten mit radioaktiv markiertem THC ist bekannt, daß es zu einer starken Akkumulation in der Leber kommt (23; 19; 20).

Demgegenüber ist es nicht überraschend, daß Verbindungen wie CBN und delta-9-THC, die doch, wie sich in vitro zeigte, höhere Spektraldissoziationskonstanten und auch höhere Hemmkonstanten hatten, in vivo in hohen Dosen appliziert werden mußten, um eine leichte Hemmung auf das Stoffwechselsystem zu bewirken. So berichteten Dingell et al. 1973 (10) und Jakubovic 1974 (21) von Untersuchungen über die Verteilung von 3 H-delta-8-THC, daß sich der größte Anteil der applizierten Menge im subzellulären Raum, bei annähernd gleicher Verteilung auf den Kern, die Mikrosomen und die Mitochondrien befindet. Auch die schnelle Verstoffwechslung dieser Verbindung könnte bedeuten, daß die Originalsubstanzen nicht lange genug in der Leber verweilen, um es zu einer bedeutungsvollen Hemmung kommen zu lassen.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit, daß die chronische Zufuhr von delta-9-THC keinen signifikanten Einfluß auf das Arzneimittelstoffwechselsystem hat. Dieses gilt sowohl für die orale als auch intraperitoneale Applikation (15).

V. Zusammenfassung
=====

Die im ersten Teil der Arbeit erstellten Bindungsspektren von delta-9-THC, CBD und CBN entsprechen den Typ I-Bindern ($\lambda_{\max} = 388 \text{ nm}$; $\lambda_{\min} = 420 \text{ nm}$). Bei der Untersuchung der Affinität der Cannabinoide zeigte sich, daß CBD ($K_S = 11,2 \mu\text{M}$) im Vergleich zu CBN ($K_S = 46 \mu\text{M}$), Δ -9-THC ($K_S = 42 \mu\text{M}$) und Δ -8-THC ($K_S = 37 \mu\text{M}$) eine 3 - 4 mal höhere Affinität zum Cyt. P₄₅₀ besitzt.

Eine noch stärkere Wirkung ging vom CBD aus auf den Abbau von Morphin und Aminopyrin. Bei der Hemmung dieser Reaktion durch die Cannabinoide ist CBD ($K_i = 4,9 \mu\text{M}$) annähernd zehnmal wirksamer im Vergleich zum CBN ($K_i = 68 \mu\text{M}$) und Δ -8-THC ($K_i = 80 \mu\text{M}$) bzw. Δ -9-THC ($K_i = 58 \mu\text{M}$). Darüberhinaus wurde bei der Hemmung durch CBD von einer bestimmten Konzentration an ($40 \mu\text{M}$) ein Wechsel im Hemmtyp von kompetitiv zu nicht-kompetitiv beobachtet.

Ein hemmender Effekt auf den Abbau von Anilin, einem ausgesprochenen Typ II-Binder, konnte trotz sehr hoher Dosen an Cannabinoiden nicht festgestellt werden.

Auch bei den Versuchen unter subchronischer Gabe von Cannabinoiden zeigte sich die dominierende Rolle des CBD. Nur bei den mit CBD vorbehandelten Tieren war ein Anstieg von Cyt. P₄₅₀ u. b₅ nachweisbar. $V_{\max}$ jedoch fiel durch CBD-Behandlung im Vergleich zu Δ -9-THC sowohl bei der Aminopyrin- wie auch Morphindemethylierung statistisch signifikant ab.

Auf die Anilinhydroxylierung hatte THC und CBD auch in vivo keinen Einfluß.

VI. Literaturverzeichnis

=====

- 1.) AGURELL, STIG; K. LEANDER: Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of Cannabis (Hashish) during smoking.
Acta Pharmaceutica Suecica 8 (1971), 391-402
- 2.) ARAMAKI, H.; N. TOMIYASU; H. YOSIHMURA; H. TSUKAMOTO: Forensic chemical study on Marihuana. A detection method of the principal constituents by thin-layer and gas chromatographies.
Chem. Pharm. Bull. 16 (5) 822-826 (1968)
- 3.) BURSTEIN, S.; D. KUPFER: Hydroxylation of trans-delta-1-Tetrahydrocannabinol by hepatic microsomal oxygenase.
Science 191 (1971), 61-67
- 4.) CAMPBELL, R.C.; (Ihm P.): Statistische Methoden f. Biologie und Medizin
Georg Thieme Verlag - Stuttgart 1971
- 5.) COHEN, G.M.; D.W. PETERSON; G.J. MANNERING: Interactions of delta-9-Tetrahydrocannabinol with the hepatic microsomal drug metabolizing system.
Science 190 (1971), 1207-1215
- 6.) CONNEY, A.H.; A. KLUTSCH: Increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with Phenobarbital and other drugs.
J. Biol. Chem. 238 (1963) 1611
- 7.) COPER, H.; M. FERNANDES: Interaction between Cannabis and other drugs.
Bayer-Symposium IV, Psychic Dependence, (1973) 135-141
- 8.) COPER, H.: Zur Pharmakologie der gebräuchlichen Rauschmittel.
Saarländisches Ärzteblatt; Vortrag vor der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes Homburg (Saar) am 15.11.71, Sonderdruck Nr. 1, 1972
- 9.) DINGELL, J.V.; H.J. WILCOX; H.A. KLAUSNER: Biochemical interactions of delta-9-Tetrahydrocannabinol.
The Pharmacologist 13 (1971) 296
- 10.) DINGELL, J.V.; K.W. MILLER, E.C. HEATH; H.A. KLAUSNER: The intracellular localization of delta-9-Tetrahydrocannabinol in liver and its effects on drug metabolism in vitro.
Biochem. Pharm. 22 949-958 (1973)

- 11.) FERNANDES, M.; COPER, H.: Sympos. on the Chem. and Biol. Activ. of Cannabis: The role of vehicles in cannabis application and interaction between cannabis and central active drugs.
Acta pharm. Suec. 8, (1971) 692-693
- 12.) FERNANDES, M.; WARNING, N.; CHRIST, W.; HILL, R.: Interaction of several cannabinoids with the hepatic drug metabolizing system.
Biochem. Pharmacol. 22, 2981-2987 (1973)
- 13.) FERNANDES, M.; S. KLUWE: On the role of Cannabidiol in the pharmacology of Cannabis.
J. Pharmacology 3 7 (1972)
- 14.) FERNANDES, M.; A. SCHABAREK; H. COPER; R. HILL: Modification of delta-9-THC-actions by cannabinol and cannabidiol in the rat. *Psychopharmakologia (Berl.)* 38 (1974) 329-338
- 15.) FERNANDES, M.; S. KLUWE; R. HILL; H. COPER: The effect of chronic delta-9-THC and Cannabis-treatment on the hepatic drug metabolizing system in the male rat.
(to be published)
- 16.) FOLTZ, R.L.; A.F. FENTIMAN; E.G. LEIGHTHY; J.L. WALTER; H.R. DREWES; W.E. SCHWARTZ; T.F. PAGE; E.B. TRUITT: Metabolite of transdelta-8-Tetrahydrocannabinol: Identification and Synthesis.
Science 168 (1970) 844-845
- 17.) GILETTE, J.R.: Mechanismus if oxydation by enzymes in the endoplasmatic reticulum. In: Biochemical aspects of antimetabolites and of drug hydroxylation,
D. Shugar, ed. *FEBS Symposium vol 16*, pp. 109-124. London-New York: Academic Press 1969
- 18.) HILDEBRANDT, A.G.; I. ROOTS; M. SPECK; K. SALLFRANK; H. KEWITZ: Evaluation of "in vivo" parameters of drug metabolizing enzyme activity in man after Clemastine, Phenobarbital or Placebo administration.
Europ. J. clin. Pharmacol. (1975) 8, 327-336
- 19.) HO, B.T.; G.E. FRITCHIE; P.M. KRALIK; L.F. ENLERT; W.M. McISAAC; J. DÄNPÄÄNHEIKKILÄ: Distribution of tritiated-L-delta-9-Tetrahydrocannabinols in rats.
Research communications in chemical Pathology and Pharmacology. 5 (1973) 215-218

- 20.) HO, B.T.; V.S. ESTEVEZ; L.F. ENGLERT: Effect of repeated administration on the metabolism of (-)-delta-9-Tetrahydrocannabinols in rats. Research communications in Chemical Pathology and Pharmacology. 5 (1973) 215-218
- 21.) JAKUBOVIC, A.; P.L. McGEER: Intracellular distribution of 3H-delta-8-Tetrahydrocannabinol in rat organs after i.v. administration. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology; Vol.9., No.1 (1974)
- 22.) JONES, G.; R.G. PERTWEE: A metabolic interaction in vivo between cannabidiol and delta-1-Tetrahydrocannabinol. Brit.J.Pharmacol. 24 (1972) 375-377
- 23.) KENNEDY, J. STEVE; W.J. WADDELL: Whole-body autoradiography of the pregnant mouse after administration of 14 C-delta-9-THC. Toxicology and applied Pharmacology 22 (1972) 252-258
- 24.) KUPFER, D.; E. LEVIN; S.H. BURSTEIN: Studies on the effects of delta-1-Tetrahydrocannabinol (delta-1-THC) and DDT on the hepatic microsomal metabolism of delta-1-THC and other compounds in the rat. Chem.-Biol. Interactions 6 59-66 (1973)
- 25.) KUPFER, D.; I. JANSSON; S. OENIUS: Spectral interactions of marihuana constituents (cannabinoids) with rat liver microsomal monooxygenase system. Chem.-Biol. Interactions, 5 (1972) 201-206
- 26.) LEMBERGER, L.; N.R. TAMARKIN; J. AXELROD; I.J. KOPIN: Delta-9-Tetrahydrocannabinol: Metabolism and disposition in long-term Marihuana smokers. Science, 173 (1971) 72-73
- 27.) LÖWE, S.: Cannabiswirkstoffe und Pharmakologie der Cannabinole. Arch. exper. Path. u. Pharmacol. Bd. 211 (1950) 175-193
- 28.) LOWRY, O.H.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR; J.R. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-295
- 29.) MECHOULAM, R.: Recent advances in cannabinoid chemistry open the area to more sophisticated biological research. Science 168 (1970) 1159-1166

- 30.) NASH, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction.
Biochem. J. 55 (1953) 416-421
- 31.) NETTER, K.J.; G.F. KAHL; M.P. MAGNUSSEN; Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. 265 (1969) 205-215
- 32.) NILSSON, I. M.; S. AGURELL; J.L.G. NILSSON; A. OHLSSON; F. SANDBERG; M. WAHLQUIST: Delta-1-Tetrahydrocannabinol: Structure of a Major Metabolite.
Science 168 (1970), 1228-1229
- 33.) OMURA, T.; R. SATO; D.Y. COOPER; O. ROSENTHAL; R.W. ESTABROOK: Function of cytochrome P-450 of microsomes.
Fed. Proc. 24, 1181 (1965)
- 34.) PATON, W.D.M.; PERTWEE, R.G.: Effect cannabis and certain of its constituents on pentobarbitone sleeping time and phenazone metabolism.
Brit. J. Pharmac. 44 (1972) 250-261
- 35.) RATING, D.; I. BROERMANN; H. HONECKER; S. KLUWE; H. COPER: Effect of subchronic treatment with (-) delta-8-trans-Tetrahydrocannabinol (delta-8-THC) on food intake, body temperature, Hexobarbital sleeping time and hexobarbital elimination in rats.
Psychopharmacologia (Berl.) 27 (1972) 349-357
- 36.) REMMER, D.; H.J. MERKER: Drug induced changes in the liver endoplasmatic reticulum: association with drug metabolizing enzymes.
Science, N.Y. 142 (1963) 1657
- 37.) REMMER, H.; J. SCHENKMAN; R.W. ESTABROOK; H. SASAME; J. GILLETTE; S. NARISIMHULU; D.Y. COOPER; O. ROSENTHAL: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 2, (1966) 187-190
- 38.) ROOTS, I.: A.G. HILDEBRANDT: Non-competitive and competitive Inhibition of mixed function oxydase in rat liver microsomes by Metyrapone.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277 (1973) 27-38
- 39.) SCHENKMAN, JOHN B.; H. REMMER; R.W. ESTABROOK: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3 (1967) 113-123

- 40.) VESELL, E.S.; G.T. PASSANANTI: Genetic and environmental factors affecting ethanol metabolism in man. Fedn. Proc. 31 (1972) 538
- 41.) WALL, M.E.: The in vitro and in vivo metabolism of Tetrahydrocannabinol. Ann. N.Y. Acad. Science 191 (1971) 23-39
- 42.) WIDMAN, M.; I.M. NILSSON; J.L.G. NILSSON; S. AGURELL; K. LEANDER: Metabolism of Cannabis. Cannabinol: Structure of a Major Metabolite formed in rat liver. Science 10, 157-162 (1971)

Herrn Professor Dr. Helmut Coper möchte ich für die Überlassung des Themas und für sein Interesse an dieser Arbeit, Herrn Dr. Maria Fernandes für seine wertvolle Betreuung herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank Frau S. Kluwe und Frl. R. Hill sowie den übrigen Mitgliedern des Institutes für die Hilfe, die zur Lösung praktischer und theoretischer Probleme führte.

LEBENS LAUF

Am 28. Dezember 1947 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Direktors Fritz Warning und seiner Ehefrau Luise, geb. Jaax, in Osnabrück geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule und anschließend das Gymnasium in Osnabrück und Meppen, an dem ich am 6. Juni 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Unmittelbar nach dem Abitur begann ich im Oktober 1967 mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich im Oktober 1974 das Staatsexamen bestand.

Im Anschluß beendete ich während einer 4-monatigen Medizinalassistentenzeit meine Doktorarbeit am Institut für Neuro- psychopharmakologie der Freien Universität Berlin. Nach 4 Monaten auf der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses zum Hl. Geist in Geseke bin ich zur Zeit auf der inneren Abteilung desselben Hauses beschäftigt.

